Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Die Titration des Virus der Lymphozytären Choriomeningitis in Agar-Suspensionskulturen von BHK21/S13-Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Axel Schoierer
aus Regensburg

Marburg 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Die Titration des Virus der Lymphozytären Choriomeningitis in Agar-Suspensionskulturen von BHK21/S13-Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Axel Schoierer

aus Regensburg

Marburg 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 1. August 1972

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. F. Lehmann-Grube
Correferent: Prof. Dr. med. R. Siegert

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung	4
B.	Definitionen und Abkürzungen	5
C.	Material und Methoden	6
	I. Zellkulturen	
	II. Virusstämme	
	III. Titration in Mäusen	
	IV. Vergleichende Titrationen in Mäusen und Zellkulturen	
D.	Experimenteller Teil	8
	I. Entwicklung eines Standardverfahrens zur quantitativen Titration des LCM-Virus in BHK21/S13-Zellkulturen	
	1. Medien	
	2. Technik des Verfahrens	
	3. Untersuchungen zum Plaquetest	
	II. Vergleichende Titration in BHK21/S13--Suspensionskulturen und in Mäusen	
E.	Diskussion	17
F.	Zusammenfassung	18
G.	Literatur	20

A. Einleitung

Die besonderen Eigenschaften des Virus der Lymphozytären Choriomeningitis (LCM) sichern ihm zunehmend das Interesse der Virologen und Immunologen. Das LCM-Virus hat die Fähigkeit bei intrazerebraler Inokulation die erwachsene Maus zu töten; die Tiere sterben am 5. bis 8. Tag nach der Infektion unter typischen Symptomen. Die intrauterin oder kurz nach der Geburt infizierte Maus hingegen überlebt in der Regel und wird für ihr weiteres Leben zum gesunden Virusträger (21). Die Bedeutung dieses Phänomens für die Immunologie als Modell der immunologischen Toleranz wurde zuerst von Burnet und Fenner erkannt (4). Während all der Jahre der Erforschung der Beziehungen zwischen LCM-Virus und Maus wurde die experimentelle Arbeit durch die Schwierigkeit der quantitativen Erfassung des Erregers behindert. Seit der Erstbeschreibung durch Armstrong und Lillie (2) wird das Virus in Mäusen titriert, obwohl es nicht an Versuchen gefehlt hat, eine handlichere, weniger aufwendige Methode zu finden. Die Erfassung des Virus in plaquebildenden Systemen, wie von Benson und Hotchin (3) und Wainwright und Mims (23) beschrieben, ist schwierig und von den Autoren selbst nicht reproduzierbar (Persönliche Mitteilungen von Mims und Hotchin). Gleiches gilt für ein von Ackermann angegebenes Verfahren (1). So hat sich für die praktische Arbeit mit dem LCM-Virus, neben der Titration in Mäusen nur eine von Lehmann-Grube und Hesse (9) ausgearbeitete quantale Methode bewährt, die auf dem Nachweis von komplementbindendem Antigen in infizierten L-Zell-Röhrchenkulturen basiert.

Kürzlich beschrieben Sedwick und Wiktor (19) einen Plaquetest zur Titration des Rabies-Virus in BHK21/S13-Zellen, welcher sich auch für das LCM-Virus als geeignet erwies. Die weitere Ausarbeitung dieser Methode und ein Vergleich mit der Titration in Mäusen ist das Thema dieser Arbeit.

B. Definitionen und Abkürzungen

Die folgenden Abkürzungen und Begriffe wurden in dieser Arbeit verwendet:

IE = Infektiöse Einheit. Eine IE ist die kleinste Virusmenge, die eine Versuchseinheit zu infizieren vermag.

ID = Infektiöse Dosis. Eine ID_{50} ist die Virusmenge, die 50% einer gegebenen Zahl von Versuchseinheiten zu infizieren vermag. Bei Vorliegen einer Poissonverteilung gilt: $1ID_{50} = 0{,}69IE$.

PBE = Plaquebildende Einheit. Eine PBE ist die Virusmenge, die unter den Versuchsbedingungen einen fokalen Ausschluss der Aufnahme von Neutralrot durch Zellen bewirkt. 1 PBE = 1IE.

LCM = Lymphozytäre Choriomeningitis.
MEM = Minimum Essential Medium (6).
BSL = Balancierte Salzlösung (8).

Quantal ist ein Titrationsverfahren dann, wenn durch jede Versuchseinheit (Tier, Zellkultur) ein nicht weiter abgestuftes Ja-oder Nein-Ergebnis erhalten wird. Demgegenüber ermöglicht bei einem quantitativen Titrationsverfahren jede einzelne Versuchseinheit eine quantitative Aussage.

C. Material und Methoden

I. Zellkulturen. Der ausschließlich benutzte BHK21 Zellklon mit der Bezeichnung S13(14) wurde freundlicherweise von Dr.T.J.Wiktor vom Wistar-Institut, Philadelphia, zur Verfügung gestellt. Die Vermehrung dieses permanenten Zellstamms erfolgt bei 37°C im geschlossenen System (Rouxflaschen von 1 l Inhalt). Dabei werden folgende Medien verwendet:

Medium 1: MEM mit 0,056% $NaHCO_3$, angereichert mit 10% Tryptosephosphat (20) und 5 oder 10% Kälberserum.

Medium 2: MEM mit 0,14% $NaHCO_3$, angereichert mit 10% Tryptosephosphat und 2% bis 5% Kälberserum. In dieses Medium wird für 1/2 Minute CO_2-Gas eingeleitet.

Trypsinlösung: BSL mit 0,028% $NaHCO_3$und 0,5% Trypsin.

Das Medium 1, in das die Zellen zunächst eingebracht werden, wird nach 2 Tagen gegen Medium 2 ausgewechselt. Nach 4 Tagen wird das Medium abgegossen, alte Medienreste werden mit BSL ausgewaschen und die Zellen mit Trypsin vom Glas gelöst. Diese werden dann wieder in Medium 1 suspendiert und in eine neue Rouxflasche eingebracht.

Die BHK21/S13-Zellen vermehren sich unter diesen Bedingungen innerhalb des viertägigen Zyklus um den Faktor ca. 6. Um diese rasche Vermehrung zu unterbrechen werden die Zellen bei Zimmertemperatur gehalten, was sie für etwa 2 Wochen gut überstehen. Sie erreichen nach einer Passage unter den üblichen Bedingungen ohne fassbare morphologische Veränderungen ihre alte Vermehrungsgeschwindigkeit wieder. Um einzelne Zellpassagen - wobei unter einer Passage das Durchlaufen des oben beschriebenen viertägigen Zyklus mit Wechsel des Glasgefäßes verstanden wird - für längere Zeit zu konservieren, wurden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

II. Virusstämme. Das hier verwendete Virus wurde in Glasampullen bei -60°C gelagert. Vor Gebrauch wurde das Material im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort verarbeitet. Ein Verlust von Infektiosität konnte so weitgehend verhindert werden (10).

Die meisten der Experimente wurden mit dem WE-Stamm (18) mit der Laborbezeichnung WE_3-30(LS)durchgeführt. Das verwendete Material hatte im hiesigen Laboratorium 2 Passagen im L-Zellen durchgemacht. Ferner wurde der Traub-Stamm (22) mit der Laborbezeichnung T-2a(Ms in.Org.) nach 2 Passagen in Mäuseorganen sowie der von Armstrong isolierte Stamm E-350(2) nach 1 Mäusepassage und 2 Passagen in L-Zellen verwendet.

III. Titration in Mäusen. Es wurden Albinomäuse eines örtlichen Händlers verwendet. Fünf Mäuse wurden mit je 0,03ml einer Verdünnungsstufe der Viruspräparation intrazerebral inokuliert. Die den 21. Tag überlebenden Tiere wurden intrazerebral mit ca. $10^3 ID_{50}$ "Armstrong"-Virus infiziert und für weitere 2 Wochen beobachtet. Die nun überlebenden Tiere, zusammen mit den in den ersten 3 Wochen gestorbenen, wurden der Berechnung der ID_{50} nach Fazekas de St.Groth zugrundegelegt (7).

IV. Vergleichende Titration in Mäusen und Zellkulturen. In 5 Experimenten wurden die Inhalte von 2 Ampullen (Ampulle 1 und 2) parallel in Mäusen und in Zellkulturen titriert. Petrischalen eines Experimentes wurden mit denselben Medien und Zellen aus einem Zellpool versorgt und im selben Brutschrank inkubiert. Die Paralleltitrationen 1 bis 3 wurden mit der 4. und 5. Zellpassage (S13-4,S13-5), die Titrationen 4 und 5 mit der 7. Zellpassage (S13-7) durchgeführt.

D. Experimenteller Teil

I. Entwicklung eines Standardverfahrens zur quantitativen Titration des LCM-Virus in BHK21/S13-Zellkulturen

1. Medien

Medium A:

Komponente I:	
MEM, 10x konzentr.	20 ml
$NaHCO_3$ (1,4%ig in H_2O)	20 ml
Penicillin und Streptomycin	100IE bzw. 10^{-4}g/ml
Aqua dest.	ad 100 ml
Kälberserum	4 ml
Komponente II:	
1% Agarose in H_2O (s.unten).	

Unmittelbar vor Gebrauch werden gleiche Teile Komponente I (37^oC) und Komponente II (42^oC) gemischt.

Medium B:

MEM, 10x konzentr.	10 ml
$NaHCO_3$ (1,4%ig in H_2O)	10 ml
Tryptosephosphat (Difco)	10 ml
Penicillin und Streptomycin	100IE bzw. 10^{-4}g/ml
Aqua dest.	ad 100 ml
Kälberserum	2 ml

Medium C:

Medium A + Medium B, gemischt im Verhältnis 3:2

Agarose:

Für diesen Plaquetest als besonders gut geeignet erwies sich die Agarose der Firma Seakem Bausch u.Lomb, die auf folgende Weise verarbeitet wird: Unter Rühren wird die Agarose 1%ig in destilliertem Wasser gelöst und eine Stunde gekocht. Als zweckmäßig erwies sich ein Abfüllen der heißen Agarose in ca. 100 ml fassende sterile Glasgefäße, die ein Wiedererhitzen erlauben. Bis zum Erkalten und Festwerden bleibt die Agarose bei Zimmertemperatur. Auf Autoklavieren wurde ver-

zichtet, da hierbei die Viskosität gelegentlich so verändert wurde, daß die Agarose bei den niedrigen Konzentrationen des Versuchs nicht ausreichend fest wurde. Zum Anfärben der Plaques wird 0,5%ige Agarose mit 1:5000 Neutralrot verwendet.

2. Technik des Verfahrens.

Die Methode von Sedwick und Wiktor (19), welche auf die ursprünglich von Cooper beschriebene Technik der Suspension von Zellen in Agarose-haltigem Nährmedium zurückgeht (5), wurde unter Verwendung der oben angegebenen Medien modifiziert.

Plastik-Petrischalen der Firmen Greiner oder Falcon, mit Durchmesser 5 cm, erhalten 4 ml Medium A. Nach Erkalten bildet sich so in den Schalen eine homogene Grundschicht von glatter Oberfläche. Die BHK21-Zellen aus Rouxflaschen werden mit Trypsinlösung vereinzelt, die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei 1000U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes werden die Zellen im Medium B bei 37°C resuspendiert.

Aus Medium A (Temperatur ca. 39,5°C) und Medium B mit den Zellen (Temperatur ca. 37°C), wird Medium C so gemischt, daß es eine Agarosekonzentration von 0,3% hat und in 1 ml 10^6-10^7 Zellen enthalten sind. Sofort nach gründlicher Durchmischung wird in jede Petrischale 1 ml dieser Zellsuspension pipettiert. So entsteht über der Grundschicht eine gleichmäßig dünne, zelltragende Lage mit glatter Oberfläche.

Von der Viruspräparation, die hier aus praktischen Gründen mit Medium B weiterverdünnt wurde, werden jeweils 0,1 ml auf die Zellschicht gebracht. Nachdem das Inokulum durch leichtes Schwenken der Schalen gleichmäßig verteilt worden ist, wird die Kultur bei 37°C in einem mit 5% CO_2 begasten Brutschrank mit gesättigter Wasserdampfatmosphäre inkubiert.

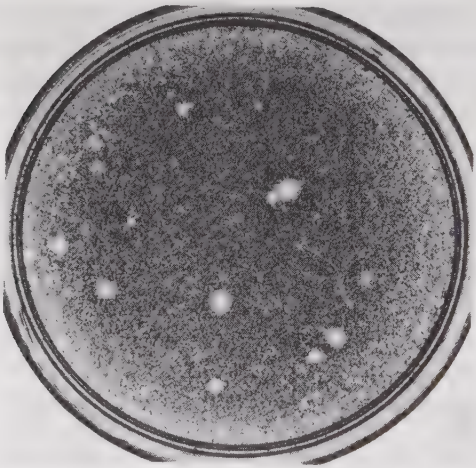
Nach 72 Stunden im Brutschrank werden die Plaques auf folgende Weise sichtbar gemacht: Auf die Zellschicht werden 2 ml der Neutralrot enthaltenden Agarose pipettiert. Nach weiteren 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C stellt sich der Plaque als

fokaler Ausschluß der Neutralrotaufnahme durch Zellen dar.

3. Untersuchungen zum Plaquetest.

Alle der hier getesteten Virusstämme (Traub,E-350 und WE) bilden Plaques. Ein Einfluß der Vorgeschichte der Viren konnte dabei nicht festgestellt werden, jedoch können genauere Angaben zu dieser Frage nicht gemacht werden. Die anschließend beschriebenen Untersuchungen wurden mit dem WE-Stamm durchgeführt. Abbildung 1 zeigt Plaques, wie dieser Stamm sie bildet.

Abb.1: Plaques von LCM-Virus, Stamm WE_3, auf BHK21/S13-Zellen.



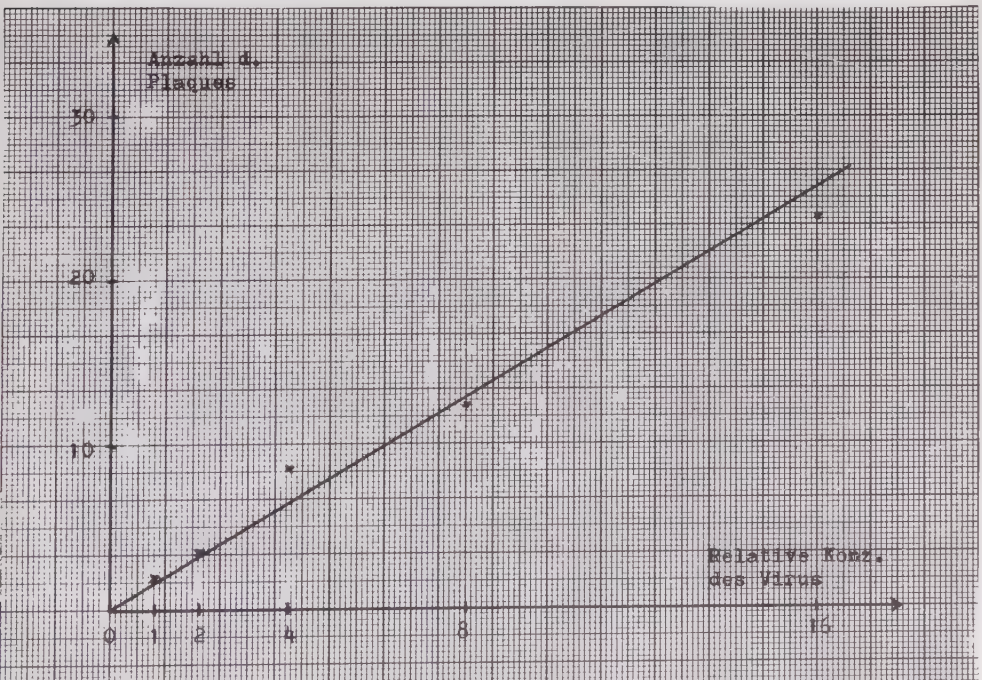
Die von Sedwick und Wiktor angegebene Brutschranktemperatur von 35°C (19) konnte auf 37°C erhöht werden, ohne die Plaquebildung zu beeinflussen. Diese Temperaturerhöhung war aus technischen Gründen vorteilhaft. Die Tabelle 1 zeigt das Ergebnis eines der Experimente, bei denen der Einfluß der Temperatur untersucht wurde.

Tab.1.: Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Titrationsergebnisse.

Verdünnung (log_{10})	Temp. °C	Zahl der Plaques (3 Petrischalen)	Summe
-5,2	35	3,9,6	18
	37	5,8,9	22
-4,9	35	8,11,8	27
	37	11,10,14	35
-4,6	35	26,29,31	86
	37	23,26,22	71
-4,3	35	42,61,58	161
	37	47,51,54	152

Plaques sind bis zu einer Anzahl von maximal 60 pro Petrischale gut zählbar, vorausgesetzt sie sind über die gesamte Oberfläche gleichmäßig verteilt. Bei höheren Zahlen kommt es zu Überlappungen.

Abb.2: Beziehung zwischen Inokulationsdosis und Plaquezahl. (Die Gerade wurde nach Augenmaß gelegt. Es liegen die Werte des in Tabelle 2 zusammengefaßten Experiments zugrunde.)



Die zu fordernde lineare Beziehung zwischen Plaquezahl und Viruskonzentration im Inokulum konnte experimentell nachgewiesen werden (Abb.2).

Tab.2: Beziehung zwischen Virusdosis und Plaquezahl (Vergl. mit Abb.2).

Verdünnung (log_{10})	Anzahl d. Plaques	Nr.d. Schale	Mittelwert
		1	
-4,3	41	2	40,5
	--	3	
	40	4	
	23	5	
-4,6	--	6	23,7
	26	7	
	22	8	
	11	9	
-4,9	10	10	12,3
	14	11	
	14	12	
	9	13	
-5,2	8	14	8,5
	9	15	
	7	16	
	5	17	
-5,5	4	18	3,5
	2	19	
	3	20	
	5	21	
-5,8	2	22	2,0
	1	23	
	0	24	
	0	25	
Kontrolle	0	26	-

Bei der oben beschriebenen Kultivierung der Zellen mit Wechsel der Glasgefäße nach jeweils 4 Tagen, befinden sich die Zellen an den beiden ersten Tagen in einem Stadium aktiver Vermehrung. Am 3. und 4. Tag ist der Boden des Glasgefäßes in der Regel mit einem dichten Zellrasen bedeckt und die Mitosehäufigkeit ist eingeschränkt. Es wäre also leicht denkbar, daß die Zellen in diesen Phasen unterschiedlicher Aktivität auch unterschiedliche Fähigkeiten zur Aufnahme und Reproduktion des Virus zeigen, was bei gleichem Virusangebot die Anzahl der Plaques in Abhängigkeit vom Alter der Zellen verändern müßte. Zur Klärung dieser Frage wurden Zellen

(Zellen A), abweichend vom üblichen Modus, ohne Wechsel der Rouxflasche bei Erneuerung des Mediums nach jeweils 2 Tagen, für 7 Tage im Brutschrank belassen. Am 7. Tag wurden diese Zellen parallel mit unter üblichen Bedingungen gehaltenen Zellen (Zellen B) für den Plaquetest verwendet. Die Ergebnisse in Tabelle 3 lassen keine Unterschiede erkennen.

Tab.3: Einfluß des Alters der Zellen auf die Empfindlichkeit gegenüber LCM-Virus

Stamm	Zahl d.Plaques in Zellen A	Zahl d.Plaques in Zellen B	Summe (A)	Summe (B)
WE	17 13 16 13	12 18 11 14	59	55
E-350	36 37 43 48	42 38 47 40	164	167

Ein Absinken der Plaquezahl bei Verwendung von BHK21/S13--Zellen mit hohen Passagenummern, wie es von Pfau beobachtet worden war (Persönliche Mitteilung), wurde im Bereich der hier verwendeten Zellpassagen nicht gesehen.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung über die zur Plaquebildung notwendige Mindestkonzentration von Zellen in der zelltragenden Oberschicht der Petrischalen. Es ist ersichtlich, daß bei einer Konzentration von 10^6-10^7 Zellen pro ml (und pro Kultur) optimale Plaques entstehen.

Tab.4: Einfluß der Zelldichte auf die Plaquebildung.

Anzahl d. Schalen	Zellen/ml	Auswertung
4	10^3	Keine Plaques
4	10^4	Keine Plaques
4	10^5	Große, unscharf begrenzte Plaques
4	10^6	Deutliche, scharf begrenzte Plaques
4	10^7	

II. Vergleichende Titration in BHK21/S13-Suspensionskulturen und in Mäusen

Die Ergebnisse von 5 Vergleichstitrationen sind für Zellkulturen in den Tabellen 5-10 festgehalten.

Tab.5: 1. Experiment

Verdünnung d.Virus (log_{10})	Anzahl d.Plaques 3 Schalen/Verdünnungsstufe Ampulle 1	Ampulle 2
	41	- (x)
-4,3	54	-
	43	-
	26	31
-4,6	21	19
	18	22
	10	11
-4,9	7	18
	9	17
	9	13+
-5,2	5	7
	4	9
	4	4
-5,5	5	5
	5	2

(x) Wegen technischer Fehler nicht ausgewertet.

Tab.6: 2. Experiment

Verdünnung d.Virus (log_{10})	Anzahl d.Plaques 3 Schalen/Verdünnungsstufe Ampulle 1	Ampulle 2
-4,3	--	--
	38	--
	42	--
-4,6	17	23
	22	34
	17	18
-4,9	--	16
	12	9
	9	--
-5,2	9	5
	--	6
	5	9
-5,5	4	3
	4	4
	-	2

Tab.7: 3. Experiment

Verdünnung d.Virus (log_{10})	Anzahl d.Plaques 3 Schalen/Verdünnungsstufe Ampulle 1	Ampulle 2
-4,3	40	46
	38	50
	--	42
-4,6	27	19
	31	20
	24	26
-4,9	14	8
	17	10
	12	12
-5,2	13	5
	7	13
	8	7
-5,5	4	3
	7	5
	3	0

Tab.8: 4. Experiment

Verdünnung d.Virus (log_{10})	Anzahl d.Plaques 3 Schalen/Verdünnungsstufe Ampulle 1	Ampulle 2
-4,3	--	16
	30	29
	34	23
-4,6	19	13
	16	10
	18	6
-4,9	9	4
	11	10
	9	4
-5,2	6	0
	7	3
	4	2

Tab.9: 5. Experiment

Verdünnung d.Virus (log_{10})	Anzahl d.Plaques 3 Schalen/Verdünnungsstufe Ampulle 1	Ampulle 2
-4,3	24	30
	26	40
	24	35
-4,6	22	28
	12	22
	16	14
-4,9	--	5
	10	5
	10	12
-5,2	8	2
	6	6
	2	4

E. Diskussion

Tab.10: Zusammenfassung der Ergebnisse von 5x2 Vergleichstitrationen in BHK21/S13-Zellkulturen und in Mäusen.

Experiment	IE/ml in $\log_{10}$ Zellkulturen		Mäuse	
	Amp. 1	Amp. 2	Amp. 1	Amp. 2
1	6,95(x)	7,05	8,28	8,17
2	6,92	7,00	7,93	7,92
3	6,99	6,96	8,11	8,14
4	6,84	6,63	8,36	8,15
5	6,78	6,86	8,43	7,92
Mittel	6,898		8,141	
Abweichung			+1,243	

(x) Berechnung nach Lorenz (13)

Wie Tabelle 10 erweist ist die Maus gegenüber dem LCM-Virus, Stamm WE_3, mehr als 10 mal so empfindlich wie die BHK 21/S13-Suspensionskultur. Dieser Vorteil wird jedoch durch die jedem quantalen Titrationsverfahren im Versuchstier eigenen vielfältigen Nachteile mehr als aufgehoben. Besonders ungünstig im Falle des LCM-Virus ist die Berechnung der ID_{50}, also der Virusmenge, die 50 % der Mäuse bei intrazerebraler Inokulation tötet. Neben der durch statistische Streuung bedingten geringen Genauigkeit (15), wird hierbei das Ergebnis noch durch das von den meisten LCM-Virusstämmen gezeigte Zonenphänomen beeinflußt. Darunter versteht man eine unter der erwarteten Todesrate bleibende Sterbeziffer der Mäuse bei Inokulation von großen Virusmengen (11). Dieses Phänomen kann als Fehlerquelle ausgeschaltet werden, wenn die ID_{50} aus der Zahl der durch die erste Infektion getöteten plus der Zahl der eine Reinfektion überlebenden Tiere berechnet wird. Diese Methode ergibt die für dieses quantale Verfahren höchst mögliche Genauigkeit (11). Inwieweit die so erhaltenen Titer von interkurrenten Infekten der Mäuse, die für den Beobachter unauffällig bleiben, beeinflußt werden, ist im Einzelfall schwer zu beurteilen. An

An die Möglichkeit einer Verfälschung auf diesem Wege muß aber immer gedacht werden. Auch können verschiedene Mäusestämme auf die Infektion mit dem Virus verschieden reagieren, wie dies für einige Inzuchtstämme von Oldstone und Dixon (17) sowie von Mims und Tosolini (16) gezeigt wurde. Zwar konnten andere Autoren das Vorliegen solcher Unterschiede nicht bestätigen (12), aber die in verschiedenen Laboratorien mit verschiedenen Mäusestämmen erzielten Resultate sind nicht ohne weiteres vergleichbar.

Neben diesen teilweise methodologisch bedingten Fehlerquellen ist die Titration in Mäusen auch unter praktischen Gesichtspunkten wenig befriedigend. Bis die Ergebnisse in Form der ID_{50} vorliegen vergehen fünf Wochen. Die tägliche Kontrolle der Tiere, ihre Fütterung und die Reinigung der Käfige sind zeitraubend und teuer. Hier ist der Plaquetest deutlich überlegen. Das Ergebnis liegt, geht man davon aus, daß BHK21/S13-Zellen routinemäßig im Labor kultiviert werden, nach 3 Tagen vor. Ist der ungefähre Titer einer Viruspräparation bekannt, läßt sich mit wenigen Plaqueschalen eine befriedigend genaue Angabe über die Zahl der infektiösen Einheiten machen, im Gegensatz zur Titration in Mäusen, bei der zum Erreichen der gleichen Genauigkeit eine große Anzahl von Tieren verwendet werden müßte.

F. Zusammenfassung

Seit seiner Erstbeschreibung im Jahre 1934 durch Armstrong und Lillie wird das Virus der Lymphozytären Choriomeningitis (LCM) in Mäusen titriert. Zwar hat es im Laufe der Zeit nicht an Versuchen gefehlt weniger aufwendige und genauere Verfahren zu entwickeln; keines jedoch hat sich allgemein durchsetzen können.

Mir war die Aufgabe gestellt worden, ein von Sedwick und Wiktor beschriebenes quantitatives Verfahren, welches auf dem fokalen Ausschluß von Neutralrot durch virusinfizierte BHK21/S13-Zellen in Agarsuspension basiert, auf seine Brauchbarkeit für die Routinearbeit zu prüfen. Die experimentellen Variablen wurden untersucht und eine Standardmethode wurde entwickelt.

In 5 Doppeltitrationen erwies sich die Mengenbestimmung des LCM-Virus in BHK21/S13-Suspensionskulturen im Vergleich mit dem bisher vorwiegend verwendeten Verfahren in Mäusen als schneller, genauer und ökonomischer.

G. LITERATUR

1. ACKERMANN,R.: Die Züchtung des Virus der Lymphozytären Choriomeningitis in der Gewebekultur. Habilitationsschrift, Köln 1961.

2. ARMSTRONG,C., and R.D.LILLIE: Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St.Louis encephalitis epidemic.Publ.Hlth.Rep. (Wash.)49,1019(1934).

3. BENSON,L.M., and J.E.HOTCHIN: Cytopathogenicity and plaque formation with lymphocytic choriomeningitis virus.Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.)103,623(1960).

4. BURNET,F.M., and F.FENNER: The production of antibodies. Second ed.Melbourne,Macmillan Co. 1949.

5. COOPER,P.D.: An improved agar cell-suspension plaque assay for poliovirus:some factors affecting efficiency of plating.Virology 13,153(1961).

6. EAGLE,H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130,432(1959).

7. FAZEKAS DE ST GROTH,S.: Production of non-infective particles among influenza viruses:do changes in virulence accompany the von Magnus phenomenon? J.Hyg.(Lond.)53,276(1955).

8. HANKS,J.H., and R.E.WALLACE: Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. Proc.Soc.exp.Biol.Med.71,196(1949).

9. LEHMANN-GRUBE,F., and R.HESSE: A new method for the titration of lymphocytic choriomeningitis viruses. Arch.ges.Virusforsch.20,256(1967).

10. LEHMANN-GRUBE,F.: Untersuchungen über das Virus der lymphozytären Choriomeningitis. I.Stabilisierung des Virus.Arch.ges.Virusforsch. 23,202(1968).

11. LEHMANN-GRUBE,F.: Dose-response relationships of lymphocytic choriomeningitis viruses in mice and L cell tube cultures. J.Hyg.(Lond.)67,269(1969).

12. LEHMANN-GRUBE,F.: Lymphocytic Choriomeningitis Virus. Monographs Vol.10.Springer-Verlag Wien, Virology 1971.

13. LORENZ,R.J.: Zur Statistik des Plaque-Testes. Arch.ges. Virusforsch.12,108(1963).

14. MACPHERSON,I., and M.STOKER: Polyoma transformation of hamster cell clones-an investgation of genetic factors affecting cell competence. Virology 16,149(1957).

15. MEYNELL,G.G.: Inherently low precision of infectivity titrations using a quantal response.Biometrics 13,149(1957).

16. MIMS, C.A., and F.A. TOSOLINI: Pathogenesis of lesions in lymphoid tissue of mice infected with lymphocytic choriomeningitis (LCM) virus. Brit. J. exp. Path. 50,584(1969).

17. OLDSTONE, M.B.A., and F.J. DIXON: Susceptibility of different mouse strains to lymphocytic choriomeningitis virus. J.Immunol.100,355(1968).

18. RIVERS,T.M., and T.F.M.Scott: Meningitis in man caused by a filterable virus. II.Identification of the etiological agent.J.exp.Med.63,415(1936).

19. SEDWICK,W.D., and T.J.Wiktor: Reproducible plaquing system for rabies, lymphocytic choriomeningitis, and other ribonucleic acid viruses in BHK-21/S13 agarose suspensions.J.Virol.1,1224 (1967).

20. STOKER,M., und I.MACPHERSON: Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivates.Nature 203, 1355(1962).

21. TRAUB.E.: Epidemiology of lymphocytic choriomeningitis in a mouse stock observed for four years. J.exp.Med.69,801(1939).

22. VOLKERT, M.: Studies on immunological tolerance to LCM virus. A preliminary report on adoptive immunization of virus carrier mice. Acta path. microbiol. scand.56,305(1962).

23. WAINWRIGHT,S., and C.A.MIMS: Plaque assay for lymphocytic choriomeningitis virus based on hemadsorption interference.J.Virol.1,1091(1967).

Lebenslauf

Ich wurde am 27. August 1943 als Sohn des Angestellten Johann Schoierer und seiner Frau Margarete, geb. Krechel, in Regensburg geboren. Mein Vater fiel als Soldat während des Zweiten Weltkriegs. Ich verlebte meine Kindheit in der Kreisstadt Burglengenfeld, wo ich auch 1949 in die Volksschule eintrat, in der ich die ersten fünf Klassen besuchte. Seit 1954 war ich Schüler am Neuen Gymnasium in Regensburg. Nach einem Schulwechsel legte ich im Juni 1964 an der Oberrealschule in Schwandorf/Bayern die Reifeprüfung ab. Im gleichen Jahr begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Universität Erlangen-Nürnberg, wo ich nach dem fünften Semester die Ärztliche Vorprüfung bestand. Danach setzte ich das Studium für zwei Semester an der Universität Graz fort. Die letzten klinischen Semester war ich an der Universität Marburg immatrikuliert. Hier legte ich im Juni 1970 das Medizinische Staatsexamen ab. Seit Oktober 1970 bin ich als Medizinalassistent tätig.

Meine akademischen Lehrer während meines Medizinstudiums waren die Professoren und Dozenten:

in Erlangen: Bauer, Fießelmann, Fleischmann, Haupt, Haustein, Horstmann, Keidel, May, Merkle, Neiss, Plattig, Stammer, Wegener, Wetterer, Wunder.

in Graz: Falk, Gotsch, Heiß, Hofmann, Kresbach, Messerklinger, Möse, Pakesch, Rathenhofer, Reiffenstuhl, Spath.

in Marburg: Bommer, Buchholz, Exner, Gedigk, Graul, Heuser, Hildebrandt, Hort, Koransky, Korb, Lehmann-Grube, Linneweh, Mann, Rohen, Schirren, Schleyer, Schmidt W., Schneider, Siegert, Streicher, Voss.